

Seleção de microrganismos produtores de celulases e de lacases a partir de efluente de fábrica de papel

Gertrudes de Oliveira Queiroz¹;
Roziana Cunha Cavalcanti Jordão²;
Alexandra Amorim Salgueiro³

Resumo

O objetivo deste trabalho foi selecionar microrganismos produtores de celulases e de lacases a partir de efluentes de fábrica de papel. As atividades enzimáticas foram detectadas pelo método de difusão em ágar; celulases, na presença de carboximetilcelulose como fonte de carbono e, lacases, utilizando ácido gálico e ácido tânico. As degradações desses substratos pelos microrganismos foram analisadas estatisticamente. Vinte e sete amostras de bactérias e nove de fungos filamentosos foram isoladas de efluentes de fábrica de papel. Cem por cento das amostras de fungos e 67 % das amostras de bactérias investigadas apresentaram atividades celulolíticas. Nenhuma amostra de bactéria e apenas uma amostra de fungo filamentoso apresentaram atividades lacases. Microrganismos produtores de celulases e de lacases apresentam potencial para aplicação em tratamento de efluente de fábrica de papel.

Palavras-chave: lacases; celulases; fábrica de papel.

SELECTION OF MICROORGANISMS FOR PRODUCTION OF CELLULASES AND LACCASES FROM PAPER INDUSTRY EFFLUENTS

Summary

The objective of this work was to select microorganisms with capacity to produce cellulases and laccases from paper industry effluents. The enzymatic activities were detected in agar, contends carboxymethylcellulose as carbon source in the medium for cellulases and, gallic acid and tannic acid for laccases. The degradation of these substrates by the microorganisms was analyzed statistically. Twenty and seven samples of bacteria and nine samples of filamentous fungi were isolated from paper industry effluents. One hundred percent of the fungus samples and 67 % of the bacterium samples presented cellulolytic activities. No bacterium sample and only one filamentous fungus sample presented laccase activities. Microorganisms that have the ability to produce

cellulases and laccases, present potential for application in biodegradation of paper industry effluent.

Keywords: laccases, cellulases, paper industry.

Introdução

No mundo atual, há uma crescente preocupação com a qualidade do meio ambiente. Com o advento da industrialização, aumentaram os rejeitos sólidos, líquidos e gasosos nos ambientes aquáticos, terrestres e aéreos.

A geração de água residuária é um produto inevitável na maioria dos processos industriais. Em sistemas de tratamento de efluentes industriais, os limites de emissões devem obedecer à legislação ambiental para proteger o corpo receptor (HORAN, 1991).

A indústria de papel pode ser destacada pela poluição ambiental gerada durante o processamento devido ao grande volume de água utilizado. Efluentes de fábrica de papel são ricos em derivados de celulose e lignina e contêm compostos aromáticos cromóforos e organoclorados que conferem coloração e toxicidade, causando impacto ambiental nos corpos receptores. Por outro lado, contêm grande quantidade de sólidos suspensos e apresentam alta temperatura, tornando os tratamentos convencionais inadequados ou de custo elevado (VIDIC; SUIDAM; BRENNER, 1994).

Nesse contexto, os processos biológicos de tratamento – por ação de enzimas e células de microrganismos – são promissores e têm sido utilizados na otimização dos tratamentos desses efluentes. Dentre as enzimas importantes no processo de biodegradação, ressaltam-se as celulases e as peroxidases (lacases). Microrganismos que apresentam tais sistemas enzimáticos têm sido investigados, podendo ser destacadas espécies do fungo filamentoso *Phanerochaete* (BHAT, 2000).

As enzimas celulolíticas hidrolisam a celulose e seus derivados, sendo responsáveis pela biodegradação de componentes de indústrias de polpa de celulose e de papel. As lacases pertencem ao grupo das oxidases que reagem com fenóis e aminas aromáticas por redução do oxigênio à água. São cupro-proteínas que atuam na descoloração dos

¹ Aluna de Engenharia Química da Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

² Professora do Departamento de Química, Pesquisadora do NPCIAMB da UNICAP e do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco - UPE

³ Professora do Departamento de Química, Pesquisadora do NPCIAMB da UNICAP

efluentes de fábrica de papel (HUBLIK; SCHINNER, 2000).

O objetivo deste trabalho foi investigar as atividades enzimáticas de celulasas e lacases em microrganismos isolados de efluentes de fábrica de papel.

Material e métodos

Amostras de microrganismos

Amostras de bactérias e de fungos filamentosos foram isoladas de efluentes de fábrica de papel, coletadas na entrada do leito de secagem e na saída da lagoa de estabilização da estação de tratamento de efluentes da PONSÁ (Papelão Ondulado do Nordeste S/A), localizada em Goiana, Pernambuco. Todas as amostras de microrganismos foram mantidas em tubos de cultura inclinados e repicados antes de serem realizados os testes enzimáticos.

Atividade enzimática

A detecção das atividades enzimáticas foi realizada pelo método de difusão em ágar. Cada amostra de microrganismo isolada foi inoculada com alça em forma de agulha em meios de culturas específicos, distribuídos em placas de Petri. A incubação foi realizada na temperatura ótima de crescimento dos microrganismos (30 ou 45 °C) durante 48 a 72 h para as bactérias e durante 7 a 14 d para os fungos filamentosos. Os resultados foram detectados pela formação de halos de degradação dos substratos ao redor das colônias. Os diâmetros dos halos e das colônias foram medidos e expressos em índices enzimáticos (IE) - relação entre diâmetros dos halos de degradação dos substratos e os diâmetros das respectivas colônias.

Foram realizadas três séries de experimentos independentes. Para avaliação dos resultados, foram aplicadas análises estatísticas, utilizando-se o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste *t*, considerando-se 95 % de confiança (VIEIRA; HOFFMAN, 1989).

Atividades celulolíticas

Para determinação da atividade celulolítica, foi utilizado carboximetilcelulose como fonte de carbono (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998). Após o crescimento dos microrganismos, as placas foram submetidas a choque térmico a 50° C, por 16 h. A revelação foi realizada adicionando-se a cada placa 10 mL da solução Vermelho Congo a 0,025 %, preparada em tampão TRIS-HCl 0,1 M e pH 8,0 durante 30 min. Após esse período, as placas foram lavadas com 5 mL de NaCl 0,5 M, preparada em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 durante 5 min.

Atividades lacases

Meios de cultura contendo ácido gálico ou ácido tânico foram utilizados para avaliar atividades lacases (DAVIDSON; CAMPBELL; BLAISDELL, 1938). A reação positiva foi evidenciada pelo aparecimento de uma zona de difusão acastanhada, que indica oxidação dos ácidos e, conseqüentemente, a presença de oxidases.

Resultados e discussão

A Tabela 1 ilustra os resultados de IE relativos às atividades celulolíticas, obtidos com amostras de bactérias isoladas de efluentes de fábrica de papel.

Dentre as 27 amostras de bactérias investigadas, 63 % das amostras apresentaram atividades celulolíticas, considerando-se desprezíveis os valores de IE < 2. Após análise estatística, foi determinada uma variação de IE entre 5 e 10, em 14 amostras de bactérias, cujos valores não são significativamente diferentes. As amostras de bactérias maiores produtoras de celulasas apresentaram IE iguais a 17, 22 e 32, cujos resultados são estatisticamente diferentes.

Todas as nove amostras de fungos filamentosos isolados apresentaram atividades celulolíticas, cujos valores obtidos de IE foram menores do que 2. Considerando o trabalho de Lealem e Gashe (1994), esses resultados foram desprezados. Ressalta-se que a visualização do halo

de degradação do substrato foi dificultada em algumas amostras de fungos cujas colônias gigantes cresceram por toda a placa.

Dentre todos os microrganismos investigados, apenas um fungo filamentosos, representado pela amostra P53, apresentou atividade relativa às lacases, utilizando-se o ácido tânico como fonte de carbono.

Saad (1992) detectou atividades celulolíticas em microrganismos isolados de tintas de paredes, utilizando carboximetilcelulose, celulose microcristalina e celulose de madeira como fontes de carbono. Todas as mostras de fungos filamentosos investigadas apresentaram atividades para as enzimas celulolíticas: endoglucanase e celobiohidrolase.

TABELA 1 Atividades celulolíticas de amostras de bactérias

Amostras de bactérias	IE ₁	IE ₂	IE ₃	IE _(média)
P37	3,9	5,7	6,2	5,3a
P23	4,5	3,1	9	5,5a
P38	3,7	8,3	5	5,7a
P2	6,1	4	7,6	5,9a
P40	4,9	8,4	4,5	5,9a
P14	7	5,5	6	6,2a
P33	4,7	10	4,9	6,5a
P20	6,4	9	6	7,1a
P24	5,4	4,4	12,3	7,4a
P30	9,8	6,7	6	7,5a
P32	9	9	6,9	8,3a
P9	8	8,6	9	8,5a
P42	8	5,7	12,7	8,8a
P19	18,5	5	5,7	9,7a
P43	16	23	12,7	17,2b
P41	8,8	19	37	21,6bc
P29	33	20	42	31,7bd

IE = diâmetro do halo de degradação do substrato / diâmetro da colônia
Os resultados que apresentam a mesma letra, estatisticamente têm a mesma atividade enzimática

Conclusões

1. 63 % das amostras de bactérias isoladas a partir de efluentes de fábrica de papel apresentaram atividades celulolíticas com IE > 2;
2. todas as amostras de fungos filamentosos investigados apresentaram atividades celulolíticas com IE < 2;
3. atividade lacase foi detectada em apenas uma amostra de fungo filamentoso;
4. microrganismos isolados de efluentes de fábrica de papel produzem celulases e lacases, podendo ser empregados na biodegradação desses efluentes.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do CNPq / PNEPG e da UNICAP. As amostras de efluentes de fábrica de papel foram cedidas gentilmente pela PONSÁ (Papelão Ondulado do Nordeste S/A).

Referências

- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.
- DAVIDSON, R. W.; CAMPBELL, W. A.; BLAISDELL, D.J. Differentiation of wood decay-ing fungi by their reaction on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 57, n. 9, p. 683-695, 1938.
- HORAN, N. J. Biological wastewater treatment systems –Theory and Operation. New York: John Wiley & Sons, 1991, 310p.
- HUBLIK, G; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme Microbial Technology**, Surrey, v. 27, p. 330-336, 2000.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 77, p. 348-352, 1994.
- SAAD, R. R. Fungi of biodeteriorated paint film and their cellulolytic activity. **Zentralbl. Mikrobiol.** [s.l.], v. 147, p. 427-430, 1992.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J.M. ; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.
- VIDIC, R. D.; SUIDAN, M. T.; BRENNER, R. C. Impact of oxygen mediated oxidative coupling on adsorption kinetics. **Water Research**, Oxford, v. 28, n. 2, p.263-268, 1994
- VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística Experimental**. São Paulo: Atlas, 1989, 178p.

Extrapolação de dados cinéticos obtidos em reatores químicos homogêneos

Valdemir Alexandre dos Santos ¹;
Eliane Cardoso de Vasconcelos ²

Resumo

Na prática industrial atual, é imperativo e econômico não se perder tempo com estudos cinéticos muito profundos de um processo químico. Neste caso, pode-se reduzir o tempo de trabalho ao extrapolar os dados de laboratório para escala piloto e, desta última, à escala comercial. Para isso, a idéia de que dois processos químicos são similares quando para uma mesma reação química são obtidas conversões iguais, serve de base para a extrapolção de parâmetros cinéticos. Realizou-se a análise dos aspectos básicos dos cálculos de reatores químicos homogêneos, incluindo importantes aspectos fluidodinâmicos na manutenção de fatores responsáveis pela semelhança entre tais equipamentos. Uma tabela com relações de escala para extrapolção de dados de um reator químico permitiu que se estabelecesse um roteiro a ser seguido, conservando-se geralmente o tipo de reator, mas multiplicando sua produção por um fator r - a razão de extrapolção, com base na manutenção de certos números adimensionais característicos. **Palavras-chave:** semelhança dinâmica; reatores homogêneos; extrapolção de dados.

Abstract

In the current industrial practice it is economic imperative not to get lost time with very deep of a chemical process kinetic studies. In this case, it can be reduced the time of work when extrapolating the laboratory data for pilot scale and, of this last one, to the commercial scale. For this, the idea that two chemical processes are said similar when for a same reaction chemistry they are obtained the same conversion, it serves as base for the kinetic parameters extrapolation. In this work are analyzed the basic aspects of the calculations of homogeneous chemical reactors, including fluid dynamics aspects important in the maintenance of responsible factors for the likeness among such equipments. The presentation and analysis of tables with scale relationships for data extrapolation of chemical reactor, allow that it observes the route to be proceeded, being generally conserved the reactor type, but multiplying its production for a factor, r - the extrapolation ratio; with base in the maintenance of certain characteristic dimensionless numbers.

Key words Dynamic similarity; Homogeneous reactor; Data extrapolation.

Introdução

Denomina-se de reatores químicos os equipamentos ou aparelhos cujo objetivo principal é a realização de uma reação química, sob condição controlada e conseqüente obtenção de um ou mais produtos dentro de especificações desejadas. Pode ser classificado, segundo a maneira de operar, em diversos tipos. Pode-se distinguir, preliminarmente, esses componentes de um processo químico dada a sua maneira contínua ou descontínua de operar. Além disso, pode-se obter uma outra classificação conforme a natureza das fases participantes, ou seja, reator homogêneo (gás e líquido) e reator heterogêneo (gás-líquido, gás-sólido, líquido-líquido, líquido-sólido e gás-líquido-sólido).

Dentro da classe dos reatores contínuos, distinguem-se ainda dois tipos: i) reatores tubulares, também conhecidos como PFR (Plug Flow Reactor), ou reatores com gradiente de concentração; e ii) reatores tipo tanque de mistura perfeita, CSTR (Continuous-Stired Tank Reactor), ou de concentração uniforme. Na prática, os reatores operam em regimes intermediários a esses dois tipos (FOGLER, 1999).

Considerado como o coração de qualquer unidade componente de um processo químico, os reatores merecem atenção especial por parte do engenheiro químico, profissional responsável pela elaboração, operação e controle desse equipamento. Neste trabalho, serão abordados os princípios de cálculos para reatores homogêneos descontínuos e contínuos. Contudo, a exposição destas notas é feita dentro das seguintes hipóteses: a) condições isotérmicas; b) nenhuma variação de volume devido à reação; c) os fluidos são incompressíveis e; d) as concentrações são consideravelmente reduzidas e os coeficientes de atividade das fases devem ser considerados muito próximos à unidade. Ao final de alguns tópicos, procura-se introduzir conceitos de semelhanças entre reatores, para se chegar às relações de extrapolção de dados de um processo químico.

¹ Professor Doutor do Departamento de Química e Pesquisador Efetivo do NPCIAMB - UNICAP, e-mail: vas@unicap.br

² Professora Doutora do Departamento de Química e Pesquisadora Colaboradora do NPCIAMB - UNICAP, e-mail: ecv@unicap.br

Reatores descontínuos

O reator descontínuo ou batelada (Figura 1) é considerado uma estrutura das mais simples e, por esse motivo, é uma das mais utilizadas para

estudos preliminares de transformações químicas. Esse equipamento consiste em um recipiente dentro do qual os reagentes são introduzidos em quantidades suficientes à obtenção do equilíbrio ou até uma conversão, α , desejada.

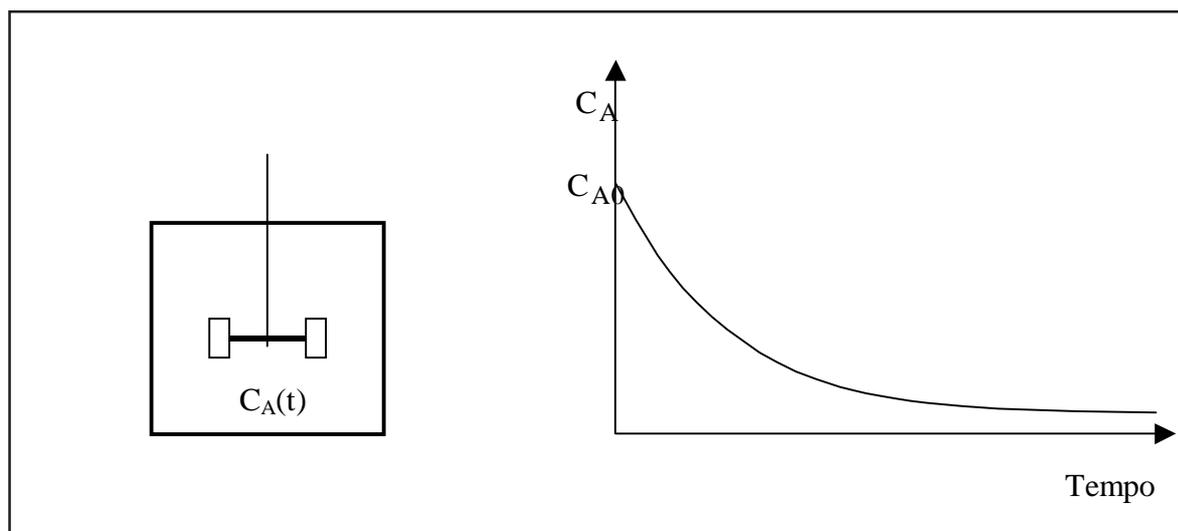


FIGURA 1 – Esquema representativo das características básicas de um reator descontínuo.

Para uma reação de primeira ordem $A \xrightarrow{k_1} B$, a conversão é calculada pela expressão:

$$\text{onde: } \alpha = \frac{C_{A0} - C_A}{C_{A0}} = 1 - e^{-k_1 t} \quad (1)$$

C_{A0} = concentração inicial da espécie A

C_A = concentração da espécie A em um tempo t

k_1 = constante de velocidade da reação

Num reator batelada, o tempo necessário para obtenção de uma conversão α é então:

$$t = -\frac{1}{k_1} \cdot \ln(1 - \alpha) \quad (2)$$

Para uma reação de segunda ordem



$$\alpha_A = \alpha_B = \frac{C_{A0} \cdot k_2 \cdot t}{1 + C_{A0} \cdot k_2 \cdot t} \quad (3)$$

$$\text{ou, } t = \frac{\alpha}{1 - \alpha} \cdot \frac{1}{C_{A0} \cdot k_2} \quad (4)$$

Nota-se, nas Equações (1) e (3), o aparecimento dos termos adimensionais: $k_1 \cdot t$ e $C_{A0} \cdot k_2 \cdot t$, respectivamente. Tais termos devem fornecer valores tais que diferentes reatores tenham a mesma